Trakya'da Riskli Bir Bölgede Tularemi İnsidansının ve Dere/Şebeke Sularında *Francisella tularensis* Varlığının Araştırılması

Investigation of Tularemia Incidence and Presence of Francisella tularensis *in Streams/Mains Water in a Risky Region of Thrace*

Mediha Uğur[1], Şaban Gürcan[2], Muzaffer Eskiocak[3], Aynur Karadenizli[4]

[1]Giresun Üniversitesi, Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Giresun, Türkiye
[2]Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
[3]Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
[4]Kocaeli Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, Türkiye

Özet

Amaç: Tularemi ülkemizde ilk kez Trakya Bölgesi'nde tespit edilmiş ve sonraki yıllarda bölgede salgınlar yaşanmaya devam etmiştir. Etkenin, 2012 yılında Kaynarca deresinin etrafındaki farelerde tespit edilmiş olması, hastalığın bu bölge için risk oluşturduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın amacı Trakya'da riskli bir bölgede insanlardaki tularemi insidansını ve dere/şebeke sularındaki *Francisella tularensis* varlığını araştırmaktır.

Yöntemler: Trakya Bölgesi'nde riskli bölgelerde bulunan 13 köy ve bir beldede yaşayan insanların serumunda mikroaglütinasyon testiyle tularemi seropozitifliği araştırıldı. Ocak 2016'da 746 kişiden alınan serumlarda seropozitiflik saptanmadı. Aynı yıl Aralık ayında bu 746 kişiden 464'üne ulaşıldı ve hiçbirinin serumunda serokonversiyon saptanmadı. Ayrıca 13 köy ve bir beldeden geçen derelerden ve şebeke sularından alınan örneklerde kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *F. tularensis* varlığı araştırıldı.

Bulgular: Etken kültürde izole edilemedi; ancak 2 dere ve 3 şebeke suyunda PCR ile *F. tularensis* DNA'sı tespit edildi. Pozitiflik tespit edilen derelerden biri, Kaynarca deresine çok yakın olan ve geçmiş yıllarda vakaların görüldüğü Celaliye köyünden geçen dere ve diğeri daha uzak mesafede olan, şimdiye kadar tularemi olgusu bildirilmeyen Kavaklı beldesinden geçen deredir. Pozitiflik tespit edilen şebeke suları Kaynarca deresi etrafında bulunan Hamzabey, Ceylanköy ve Tatarköy köylerinden alınan şebeke sularıdır. Pozitiflik saptanan şebeke sularında, suların klorlanması sonrası moleküler inceleme tekrarlandı ve tularemi PCR pozitifliği saptanmadı.

Sonuçlar: Bu çalışmada tularemi insidansı sıfır olarak hesaplanırken, etken sularda tespit edildi. İnsanlarda seropozitiflik saptanmamış olsa da, 5 su örneğinde PCR ile etkenin tespit edilmesi zaman zaman etkenlerin su kaynaklarına ulaşabileceğini

Abstract

Objective: Tularemia was first detected in Thrace region in our country and the outbreaks continued in the region over the following years. The fact that the agent has been identified in mice around Kaynarca in 2012 suggests the disease poses a risk for our region. Aim of this study was to investigate tularemia incidence and presence of *Francisella tularensis* in streams/mains water in a risky region of Thrace.

Methods: In this study, seropositivity for tularemia was investigated in 13 villages, and 1 town in risky areas of the Thrace region. In January 2016, blood was drawn from 746 people and tularemia microagglutination tests were applied. Seropositivity was not detected. In December, 464 of 746 people were reached. Seroconversion was not observed. In addition, culture and polymerase chain reaction (PCR) procedures were applied to specimens collected from mains water and streams in 13 villages and 1 town.

Results: The causative agent wasn't isolated from the cultures but *F. tularensis* DNAs were detected by PCR method in 2 stream, and 3 mains water samples. One of the streams passed through the village of Celaliye, which was very close to Kaynarca, where tularemia cases were seen in the past. The other was farther, passing through the Kavaklı town in which no cases has been reported. The mains water which were positive were from Hamzabey, Ceylanköy, and Tatarköy villages located around Kaynarca. Molecular examination after chlorination was repeated in the water sources in which positivity was detected, and it was seen that the agent was eliminated.

Conclusions: In this study, incidence was calculated as zero, although the causative agent was found in the water. Although no seropositivity was detected, the detection of the agent by PCR in 5 water samples showed that the agents in the nature could

ORCID iDs of the authors: M.U. 0000-0002-2526-397X; Ş.G. 0000-0002-5052-481X; M.E. 0000-0002-4682-545X; A.K. 0000-0002-8267-5284

Cite this article as: Uğur M, Gürcan Ş, Eskiocak M, Karadenizli A. [Investigation of tularemia incidence and presence of Francisella tularensis in streams/mains water in a risky region of Thrace]. *Klimik Derg*. 2019; 32(1): 78-83. Turkish.

Yazışma Adresi / Address for Correspondence:
Şaban Gürcan, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye
E-posta/E-mail: saban_gurcan@yahoo.com

(Geliş / Received: 5 Mart / March 2018; Kabul / Accepted: 7 Ekim / October 2018)
DOI: 10.5152/kd.2019.17

gösterdi. Riskli bölgelerde sürveyans çalışmalarının yapılmasının salgınları önlemede etkin olabileceği görüldü.
Klimik Dergisi 2019; 32(1): 78-83.

Anahtar Sözcükler: *Francisella tularensis*, tularemi, seroloji, polimeraz zincir reaksiyonu, insidans.

reach the water resources. It has been observed that surveillance studies in risky areas could be effective in preventing possible outbreaks.
Klimik Dergisi 2019; 32(1): 78-83.

Key Words: *Francisella tularensis*, tularemia, serology, polymerase chain reaction, incidence.

Giriş

Tularemi, *Francisella tularensis*'in neden olduğu zoonotik bir hastalıktır. Hastalık tarih boyunca, avcı hastalığı, tavşan ateşi, geyik sineği ateşi, kene ateşi, Ohara ve Yato-byo hastalığı gibi isimlerle anılmıştır (1-3). Etken olan bakterinin potansiyel bir biyolojik terör ajanı olması, infektif dozunun çok düşük olması, hastalığın tanısında ve tedavisinde yaşanan zorluklar ve son yıllarda ortaya çıkan salgınlar nedeniyle tularemi yeniden önem kazanan hastalıklar arasında yer almaktadır (4-8). Dünyada en sık olarak ülseroglandüler form görülmesine rağmen ülkemizde en sık görülen formu orofaringeal tularemidir (9-11). Zoonotik bir hastalık olan tularemi için farklı bulaşma yolları olmakla birlikte orofaringeal formda en önemli bulaşma yolu infekte suların kullanımı, içilmesi ve bu sularla temastır (12-14). Suların kontamine olmasında ve böylece hastalığın bulaşmasında ve yayılmasında kemiricilerin önemli rol oynadığı düşünülmektedir (9,15). Kemiricilerden sulara, sulardan insanlara bulaşma, üzerinde durulması gereken bir döngüdür.

Hastalık Türkiye'de ilk kez 1936 yılında Lüleburgaz'da Kaynarca deresi etrafındaki köylerde yaklaşık 150 kişinin etkilendiği bir salgın şeklinde görülmüştür (16). Aynı bölgede 9 yıl sonra 18 kişinin etkilendiği ikinci bir salgın ortaya çıkmıştır (9). Ülkemizde ilk salgından sonra bölgede yapılan incelemelerde hastalığın rezervuarı olan tarla ve su farelerinin salgın döneminde bir artış gösterdiği yönündeki gözlemler, tularemi salgınında farelerin rolü olabileceğini düşündürmüştür (17). Bölgemizde 2012 yılında yapılan bir çalışmada etken, Kaynarca deresi kenarında yakalanan iki farede moleküler yöntemlerle tespit edilmiştir (15). Etkenin farelerde tespit edilmiş olması Trakya bölgesinin hastalık açısından riskli bir bölge olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı Trakya'da riskli bir bölgede insanlarda tularemi insidansını ve dere/şebeke sularında *F. tularensis* varlığını araştırmaktır. Böylece etkenin sulardaki varlığının ve bölge halkının etkenle karşılaşıp karşılaşmadığını açıklığa kavuşturulması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Bu çalışma yerel Etik Komitenin 15.04.2015 tarih ve 07.05 no.lu onayı ve Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nun izniyle gerçekleştirildi ve Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TÜBAP) 2015/128 numaralı proje desteğiyle yapıldı.

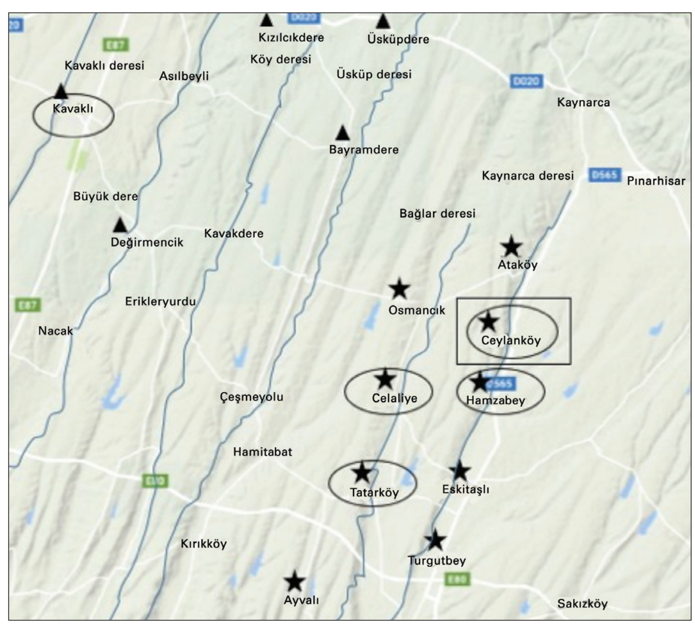
Trakya Bölgesi'nde 1936 yılında tularemi salgınının gerçekleştiği Kaynarca Deresi etrafındaki köyler riskli bölge ve bu köylerde yaşayan insanlar risk grubu olarak kabul edildi. Kaynarca deresi etrafında bulunan Kırklareli iline bağlı Ataköy, Ayvalı, Hamzabey, Celaliye, Ceylanköy, Eskitaşlı, Tatarköy, Turgutbey ve Osmancık köyleri riskli bölge olarak ve Kaynarca deresine paralel başka dereler etrafındaki Üsküpdere, Bayramdere, Kızılcıkdere, Değirmencik köyleri ve Kavaklı beldesi kontrol bölgesi ve bölgede yaşayan insanlar kontrol grubu olarak belirlendi (Şekil 1).

Çalışmanın Trakya bölgesinde yapılacak olmasından dolayı Kılınç ve arkadaşları (18)'nın tespit ettiği seroprevalans değeri esas alınarak örneklem büyüklüğü hesaplandı. Köylerin toplam nüfusu Türkiye İstatistik Kurumu 2013 verilerine göre 12 561 olarak belirlendi. Seroprevalans değeri %0.3 alınarak toplam 728 kişi hesaplandı.

Çalışmaya katılması planlanan 13 köy ve 1 belde Ocak 2016'da ziyaret edildi. Tularemi hastalığı hakkında sağlık çalışanları ve köy halkı sunum yapılarak bilgilendirildi. Hastalık hakkında hazırlanan bilgilendirme yazıları dağıtıldı ve posterler asıldı.

Çalışmaya dahil edilen gönüllü kişilerin kanları alındı ve Tularemi Anket Formu dolduruldu. Formlardan elde edilen risk ve kontrol grubuna ait bilgilerle ilgili istatistiksel değerlendirme yapıldı. *p* değeri <0.05 bulunduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ocak ayında çalışmaya dahil edilen ve kanları alınan 746 kişiye Aralık ayında tekrar kanları alınmak üzere ulaşılmaya çalışıldı. Kişilerin gönüllü olmaması, başka bölgeye taşınmış olması, okul ve işte olmaları nedeniyle kişilere ulaşılamaması gibi nedenlerden dolayı 464 kişiden tekrar kan alınabildi. Alınan kanların serumları ayrılarak aynı hafta içinde çalışılacağı güne kadar +4°C'de saklandı.

Mikroaglütinasyon testleri için patentli tularemi antijeni (Patent no: TPE-2008/01623 B-Şaban Gürcan) kullanıldı. Mikroaglütinasyon testleri, sonuçların daha iyi değerlendirilebil-



Şekil 1. Çalışmaya dahil edilen 13 köy ve 1 belde. Kontrol grubu üçgen, risk grubu yıldızlarla belirtilmiş, polimeraz zincir reaksiyonu pozitif çıkan köyler ve belde yuvarlak içine alınmıştır. 2006 yılında 2 olguda tularemi seropozitifliği olan köy ayrıca dikdörtgen içine alınmıştır. Kavaklı beldesiyle riskli bölge arası kuş uçuşu yaklaşık 23 km'dir.

Tablo 1. Risk Faktörlerinin İstatistiksel Açıdan Değerlendirilmesi

Risk Faktörleri	Risk Grubu (n=397) %	Kontrol Grubu (n=349) %	*p*
Av hayvanı yeme	11.33	16.04	0.061
Av hayvanıyla temas	6.29	8.3	0.290
Fareyle temas	2.51	4.3	0.178
Fare sayısında artış	3.27	8.88	0.001
Kemirici atıklarına rastlama	35.77	29.22	0.057
Kemirici ölüsü görme	29.47	28.08	0.676
Böcek ısırığı	23.17	12.61	0.000
Çevreden yiyecek toplama	16.4	11.46	0.054
Çevreden su içme	3.27	4.9	0.268
Dereden bahçe sulama	16.62	7.16	0.000
Derede yüzme	17.63	4.87	0.000
Ev içinde hayvan	2.01	3.44	0.230
Bahçede hayvan	62.5	63.32	0.809
Ev hayvanlarında ölüm	3.02	1.43	0.146
Doğada uğraş	62.47	57.02	0.130
Su klorlanması	99.24	99.14	0.874
Yağmurlu günlerde su bulanıklığı	14.10	13.75	0.890

mesi için V plağı kullanılarak gerçekleştirildi. Negatif kontrol olarak serum fizyolojik, pozitif kontrol olarak tularemili hasta serumu kullanıldı.

Ocak 2016'da her köyden ve beldeden bir dere bir şebeke suyu olmak üzere ikişer adet 5'er litrelik su örnekleri alındı ve aynı akşam +4°C'ye kaldırıldı. Eşzamanlı olarak şebeke sularında ortotolidin solüsyonu kullanılarak komparatör klor ölçüm cihazıyla bakiye klor miktarları ölçüldü. Şebeke sularında klor ölçümü yapılmadan önce klor ölçüm kiti Kırklareli Halk Sağlığı Müdürlüğü'nde şebeke suyunda denendi ve sonuç 0.5 ppm olarak tespit edildi. Ayrıca Kırklareli Halk Sağlığı Müdürlüğü'nün çalışma yapılan köylerdeki 1 yıllık klor ölçüm sonuçları incelendi. Yılın son ayı yine aynı dere ve çeşme sularından örnekler alındı.

Alınan su örneklerine filtrasyon işlemi uygulandı. Filtre işleminde 0.2 μm por çaplı selüloz nitrat filtreler (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Almanya) kullanıldı.

Kültür için antibiyotikli Francis besiyeri (100 ml için 100 000 ünite penisilin, 10 ml siklohekzimid, 1 gr glikoz, 0.1 gr sistin) hazırlandı. Üreme kontrolü için -80°C'de saklanan, Yazıkara'dan izole edilen bakteri suşu kullanıldı. Bakteri ekimi gerçekleştirilen besiyerinde 4. günde %5 CO_2'li etüvde daha yoğun olmak üzere *F. tularensis* üremesi gerçekleşti.

Her bir su örneğinin yarısı filtre edildi ve filtreler steril pensle alınarak Francis besiyerine yerleştirildi. Besiyerleri 37°C'de %5 CO_2'li etüve kaldırıldı ve 10 gün boyunca her gün *F. tularensis* üremesi açısından değerlendirildi. Şüpheli kolonilere Gram boyaması yapıldı. Gram boyamasında Gram-negatif basil morfolojisinde görünen bakterilere oksidaz ve katalaz testleri uygulandı.

Alınan su örneklerinin diğer yarısı da filtre edildi. Selüloz nitrat filtreler 5 ml steril distile su içeren Falcon® tüpleri içerisine alındı. Tüpler 10 dakika vortekslenerek filtreye tutunmuş olabilecek bakterilerin distile suya geçmesi sağlandı. Ardından filtreler atıldı ve Falcon® tüpleri 1500 devirde 20 dakika santrifüj edildi. Üste kalan kısım atılarak yaklaşık 200 μl çökelti DNA izolasyonu için kullanıldı. Elde edilen DNA'lar polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) işlemi yapılacak güne kadar -80°C'de saklandı. PCR işlemi daha önce tanımlandığı şekilde yapıldı (19).

Bulgular

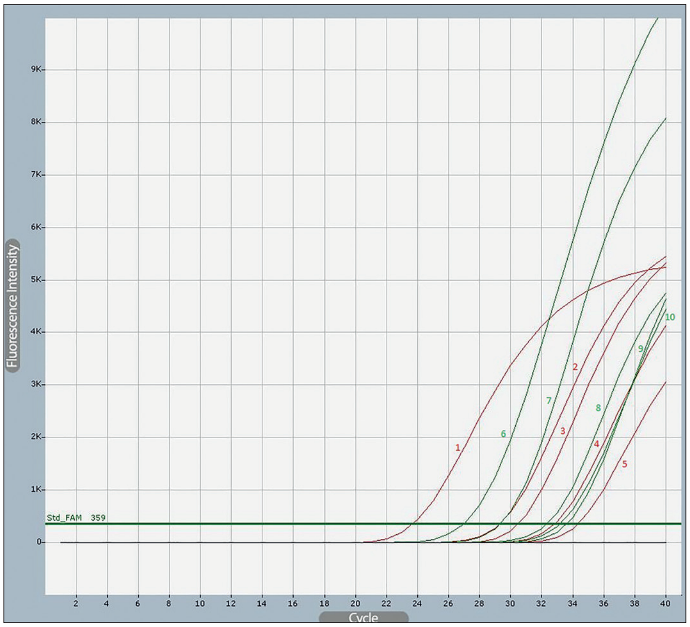
Yılın ilk ayında risk grubuna ait 397, kontrol grubuna ait 349 olmak üzere toplam 746 gönüllü çalışmaya katıldı. Risk grubunda yer alan köylerdeki 397 gönüllünün 197'si kadın, 200'ü erkekti. Meslekleri sorgulandığında 18'inin avcılık, 75'inin çiftçilik, 5'inin hayvancılıkla uğraştığı tespit edildi. Risk grubunda gönüllülerin yaş ortalaması 53 olarak hesaplandı. Risk grubundaki gönüllülerde tularemi bulaşması açısından risk faktörleriyle temas sorgulandığında, av hayvanı yeme %11.3, av hayvanıyla temas %6.3, fareyle temas %2.52, çevreden su içme %3.27, dereden bahçe sulama %16.62 ve derede yüzme %17.63 olarak hesaplandı (Tablo 1). Risk grubundaki gönüllülerinin kullandıkları su kaynakları sorgulandığında %99.75 oranında şebeke, hazır su veya arıtıcı kullanarak şebeke suyu kullandıkları tespit edildi. Risk grubuna dahil edilen 397 kişiden 394'ü sularının klorlandığını belirtti.

Kontrol grubu olan köylerde toplam 349 gönüllünün 164'ü kadın, 185'i erkek; 3'ü avcı, 46'sı çiftçi, 4'ü hayvancılıkla uğraşıyordu. Yaş ortalaması 52.3 olarak hesaplandı. Kontrol grubundaki gönüllülerde risk faktörleriyle temas sorgulandığında, av hayvanı yeme %16.04, av hayvanıyla temas %8.3, fareyle temas %4.3, çevreden su içme %4.9, dereden bahçe sulama %7.16 ve derede yüzme %4.87 bulundu. Gönüllülerin kullandıkları su kaynakları sorgulandığında %99.14 oranında kaynak suyu dışındaki su kaynaklarını kullandıkları tespit edildi. Kontrol grubuna dahil edilen 349 kişiden 346'sı sularının klorlandığını belirtti.

Kontrol ve risk grubu, risk faktörleri açısından χ^2 testiyle değerlendirildi. Farelerde artış kontrol grubunda, böcek ısırığı, dereden bahçe sulama ve derede yüzme risk grubunda anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 1).

Ocak ve Aralık 2016'da çalışmaya katılan gönüllülerin hiçbirinde seropozitiflik saptanmadı. Seronegatif durumdan seropozitif hale dönen hiçbir olguya rastlanmadığından 2016 yılı için tularemi insidansı sıfır olarak hesaplandı.

Çalışmaya dahil edilen 13 köy ve 1 beldeden Ocak ve Aralık 2016'da alınan dere ve şebeke suyu örneklerinin kültüründe *F. tularensis* üremedi. Dere sularında Ocak ve Aralık 2016'da *F. tularensis* dışında Gram-negatif basil, Gram-pozitif basil, Gram-pozitif kok morfolojisinde bakteri ve funguslar şeklinde karışık üremeler oldu. Şebeke sularının bazılarında da *F. tularensis* dışında bakteri üremeleri oldu. Ocak ve Aralık 2016'da yapılan klor ölçümlerinde bakiye klor 0 ppm olarak tespit edildi. Ayrıca Kırklareli Halk Sağlığı Müdürlüğü tarafından yapılan 1 yıllık klor ölçüm sonuçlarına göre; köylerde yapılan klorlamanın yetersiz olduğu görüldü.



Şekil 2. Pozitif kontrollerle birlikte pozitif saptanan su örneklerinin "real-time" polimeraz zincir reaksiyonu eğrileri. 1: 10^4 "genomic equivalent" (GE) pozitif kontrol, 2: 10^3 GE pozitif kontrol, 3: 10^2 GE pozitif kontrol, 4: 50 GE pozitif kontrol, 5: 25 GE pozitif kontrol, 6: Tatarköy şebeke suyu, 7: Kavaklı dere suyu, 8: Hamzabey şebeke suyu, 9: Ceylanköy şebeke suyu, 10: Celaliye dere suyu.

Yılın ilk ve son aylarında her köyden birer adet olmak üzere dere ve şebeke suyu alındı ve *F. tularensis* için "real time" PCR uygulandı. Ocak 2016 yılında alınan örneklerde pozitiflik tespit edilmezken, Aralık 2016'da alınan örneklerin beşinde pozitiflik saptandı. Kavaklı beldesi ve Celaliye köyünden alınan dere sularında ve Hamzabey, Tatarköy, Ceylanköy köylerinden alınan şebeke sularında *F. tularensis* DNA'sı tespit edildi. Pozitiflik tespit edilen 4 köy risk grubundayken, Kavaklı beldesi kontrol grubunda yer alıyordu. Kantitasyon amacıyla pozitif kontrolün dilüsyon sonuçlarıyla sulardan elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Kavaklı dere suyu 10^3 "genomic equivalent" (GE), Celaliye dere suyu 25 GE, Hamzabey şebeke suyu 50 GE, Tatarköy şebeke suyu 10^3 GE, Ceylanköy şebeke suyu 50 GE olarak tespit edildi (Şekil 2). Negatif kontrolde amplifikasyon saptanmadı.

İrdeleme

Tularemi, Türkiye'de ilk kez 1936 yılında Trakya bölgesinde bildirilmiştir (16). Lüleburgaz'da 1945 yılında ikinci bir salgın yaşanmıştır (9). Bölgede uzun bir sessizliğin ardından 2005 yılında Edirne Demirköy'de, 2010 yılında Tekirdağ Muzruplu'da hastalık yeniden ortaya çıkmıştır (6,20). Bu salgınlar bize etkenin çok eski yıllardan beri bölgemizde var olduğunu ve uzun bir sessizliğin ardından yeniden ortaya çıktığını göstermektedir.

Risk grubu olarak seçilen bölge 1936 yılında tularemi vaka bildirimlerinin olduğu ve 2012 yılında *F. tularensis* taşıdığı tespit edilen farelerin yakalandığı Kaynarca deresinin etrafındaki Ataköy, Ayvalı, Hamzabey, Celaliye, Ceylanköy, Eskitaşlı, Tatarköy, Turgutbey ve Osmancık köyleridir (15). Kontrol grubu olarak seçilen bölge bu dereye paralel başka derelerin etrafındaki Üsküpdere, Bayramdere, Kızılcıkdere, Değirmencik köyleri ve Kavaklı beldesidir. Kontrol grubunda bulunan köylerin özelliği şu ana kadar hiçbir tularemi olgusunun bildirilmediği veya etkenin başka kaynaklarda gösterilmediği köyler olmasıdır. Son yıllarda vaka bildirimi olmamasına rağmen 2012 yılında etkenin Kaynarca deresi etrafından yakalanan farelerde tespit edilmiş olması hastalığın hâlâ bu bölge için bir risk oluşturduğunu göstermektedir (15).

İlk salgınların Trakya bölgesinde yaşanmasının ardından diğer bölgelerde de birçok salgın yaşanmış ve vaka bildirimleri olmuştur. Günümüze kadar yapılan seroprevalans çalışmalarının çoğu bir salgın veya vaka bildiriminin ardından yapılmışken ülkemizde gerçek anlamda insidans çalışması yoktur. Bu çalışma prospektif bir insidans çalışmasıdır ve henüz bir salgın veya vaka bildirimi olmayan fakat geçmiş yıllardaki verilere dayanarak riskli olduğu tespit edilen bölgelerde gerçekleştirilmiştir.

Bildiğimiz kadarıyla ilk defa 2006 yılında Edirne'de bir salgın yaşanmadan veya bir vaka bildirimi olmadan geniş kapsamlı bir çalışma yapılmış ve seroprevalans değeri %0.3 olarak bulunmuştur (18). Sunulan çalışmada 2016 yılının ilk ve son aylarında gönüllü serumlarında *F. tularensis*'e karşı gelişen antikorlar aranmış ve insidans hesaplaması yapılması hedeflenmiştir. Ocak 2016'da bölgede yaşayan 746 kişiye ulaşılmış ve seropozitiflik tespit edilmemiştir. Aralık 2016'da aynı kişilere ulaşılmaya çalışılmış fakat taşınma, çalışmanın yapıldığı dönemde köyde bulunmama veya gönüllü olmama gibi nedenlerden dolayı 464 kişiye ulaşılmıştır. Yılın ilk ve son aylarında gönüllü serumlarında yapılan tularemi mikroaglütinasyon testinde seronegatif durumdan seropozitif hale dönen hiçbir olguya rastlanmamış ve insidans 0 olarak hesaplanmıştır.

Gönüllülere doldurulan anket formlarının değerlendirilmesinde, çoğunluğunu Kavaklı beldesinde yaşayanların oluşturduğu kontrol grubunda çevredeki farelerde artış olduğunu ifade edenlerin sayısı risk grubuna göre anlamlı olarak fazla saptanmıştır. Geçmiş dönemlerde farelerde artış sonrasında fareler aracılığıyla sulara tularemi etkeninin bulaştığı ve sunulan çalışmada da Kavaklı deresinde moleküler testlerde etken varlığının saptanması düşünüldüğünde farelerin hâlâ etkenleri taşıdığı ve dere sularına bulaşmada hâlâ rol oynama olasılığının olduğu söylenebilir. Diğer bir olasılıksa, Kavaklı deresinde sularda saptanan PCR pozitifliğinin, bu sularda bulunan amiplerin içinde yaşayan bakterilerden kaynaklanıyor olabilmesidir (21). Risk grubunda ise böcek ısırığı, dereden bahçe sulama ve derede yüzme hikayelerinin anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen köylülerde hiç seropozitiflik saptanmaması, bölgedeki böceklerin etkeni taşımaması, tespit edilen sularda canlı bakterilerin bulunmamasıyla açıklanabilir.

Ülkemizde sık olarak görülen orofaringeal tularemide en önemli bulaşma yolu sudur ve suların fare gibi kemirgenlerle kontamine olduğu düşünülmektedir (17,22). Trakya bölgesinde 2012 yılında Kaynarca deresi etrafında yakalanan iki farede PCR ile etken DNA'sı gösterilmiştir (15). Etkenin bölgedeki farelerde tespit edilmiş olması suların fareler tarafından kontamine edilme riskini düşündürmektedir.

Çalışmamızda suların kontaminasyonu riskini ortaya çıkarmak amacıyla Kaynarca deresi boyunca olan dere kollarından ve bu derelerin geçtiği köylerdeki şebeke sularından ve

paralel başka dere ve bu derelerin içinden geçtiği köylerdeki şebeke sularından örnekler alınmıştır. Yapılan kültür işlemi sonucu *F. tularensis* izole edilememiş fakat etken DNA'sı PCR ile 2 dere ve 3 şebeke suyunda pozitif olarak saptanmıştır. Derelerden biri risk grubu olarak kabul edilen Kaynarca deresine çok yakın olan ve 1936 yılında vakaların görüldüğü Celaliye köyünden geçen dere iken, diğeri aynı bölgede fakat daha uzak mesafede olan ve kontrol grubu olarak kabul edilen Kavaklı beldesinden geçen deredir. Ayrıca 1936 yılında olgu bildirimlerinden dolayı risk grubu olarak kabul edilen Kaynarca deresi etrafında bulunan Hamzabey, Ceylanköy ve Tatarköy köylerinden alınan şebeke sularında da etken DNA'sı tespit edilmiştir. Dedeoğlu-Kılınç ve arkadaşları (18) tarafından 2006 yılında yapılan seroprevalans çalışmasında Ceylanköy'de yaşayan 2 kişide tularemi seropozitifliği saptanmış olması düşünüldüğünde, aynı yerde 10 yıl sonra şebeke suyunda etkenin DNA'sının gösterilmiş olması ilginçtir. Bu bulgular riskli bölgede riskin devam ettiğini, hatta yakın bölgelere de riskin yayıldığını düşündürmüştür. Kontrol grubunun yaşadığı Kavaklı deresinde de PCR pozitifliğinin saptanmış olması, çalışma grubunun yaşadığı bölgeye komşu olması nedeniyle etkenin fareler aracılığıyla yakın bölgelere de yayılabileceğini veya riskli bölgenin aslında tahmin edilenden de daha geniş olabileceğini düşündürmüştür.

Etkenin varlığını söyleyebilmek için altın standard yöntem kültürdür. Kültürün duyarlılığının %25 gibi çok düşük oranda olduğu göz önüne alındığında PCR ile etken DNA'sı tespit edilirken bakterinin kültürle üretilememesi olağan bir durumdur (9). Birçok çalışmada etken çok düşük oranlarda kültürde üretilebilmiştir. Bursa'da 205 tularemi vakasının incelendiği bir çalışmada, sadece 10 hastadan alınan örneklerde etken kültürde üretilmiştir (23). Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2005-2006 yıllarında tularemi tanısı konulan 12 hastaya ait 16 örnekte kültür yapılmış, sadece iki hastanın lenf nodu aspiratından etken üretilmiştir (24). Şimşek ve arkadaşları (25) üç farklı salgında toplanan 154 klorlanmamış su örneğine kültür ve PCR işlemi uygulamış ve örneklerin 4 tanesinden *F. tularensis* izole edebilmişlerdir. Toplanan örneklerin 17 tanesinde ise PCR ile bakteri DNA'sı tespit etmişlerdir. Bütün bu çalışmalar etkeni kültürle üretmenin zor olduğunu göstermektedir. Sunulan çalışmada da etkenin sulardan izole edilememesi doğal bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Son yıllarda moleküler teknikler, klinik ve çevresel örneklerden bakterinin tespitinde önem kazanmıştır. "Real-time" TaqMan PCR, su örneklerinde etken DNA'sını tespit etmek için sıklıkla kullanılmaktadır (26). Çalışmada "real-time" TaqMan PCR yöntemi kullanılmış ve 5 su örneğinde *F. tularensis* DNA'sı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda şebeke sularından örnek alınırken eşzamanlı klor ölçümü yapılmış ve klor değerleri 0 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle sunulan çalışmada sularda tularemi etkeninin saptanmış olması şaşırtıcı değildir.

İçme suyu olarak kullanılan şebeke sularında etkenin DNA'sının tespit edilmesine karşın hiç vakaya rastlanmamıştır. Örnek alımının hemen ardından suların klorlanmış olması olası bir salgını önlemiş olabilir. Ayrıca PCR ile ölü bakteri DNA'larının tespit edilmiş olma olasılığı da salgın oluşmama nedenleri arasında gösterilebilir.

F. tularensis'in infektif dozu düşük olmasına rağmen insanlardaki infeksiyöz doz, bulaşma şekline göre farklılıklar göstermektedir. Deriden veya mukozal yolla alınan 10-50 bakteri, sindirim yoluyla alınan 10^8 bakteri infeksiyon oluşturabilmektedir (27-29). Çalışmada PCR ile Kavaklı dere suyunda ve Tatarköy şebeke suyunda 10^3 GE bakteri DNA'sı tespit edilirken, Hamzabey şebeke suyu ve Ceylanköy şebeke suyunda 50 GE bakteri DNA'sı, Celaliye dere suyunda 25 GE bakteri DNA'sı kadar düşük oranlarda DNA tespit edilmiştir. Sindirim yoluyla bulaşmada infektif dozla ilgili yayınlar kısıtlı olmakla birlikte bu miktarların bulaşma için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Nitekim hiç vakaya rastlanmamış olması bunu destekler niteliktedir. PCR pozitifliğine rağmen olgu saptanmamasının diğer bir nedeni, PCR ile saptanan DNA'ların aslında canlılığını/infektivitesini yitirmiş bakterilere ait olması da olabilir. Böylece insanlarda hastalığa yol açmamış olabilir.

Erken dönemlerde antikorların serumda saptanamamasının yanı sıra immünosüprese konakta veya normal şartlarda da bazı konaklarda antikorlar negatif kalabilmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada tularemi klinik tablosu gösteren bir hastada etken DNA'sı PCR ile tespit edilirken serumda antikor tespit edilememiştir (30). Çanakkale'de meydana gelen salgında bir kişiden alınan boğaz sürüntü örneğinde etken DNA'sı PCR ile tespit edilirken ilk ve 1 ay sonra alınan ikinci serum örneklerinde seropozitiflik saptanmamıştır (22). Trakya bölgesinde fareler üzerinde yapılan bir çalışmada seronegatif olan iki farede etken DNA'sı PCR ile tespit edilmiştir (15). Çalışmalar erken dönemlerde serumda antikor saptanamayabileceğini ve bazen antikorların negatif kalabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda etkenin DNA'sı sularda tespit edilirken seropozitiflik saptanmamasının diğer olası nedenleri bu durumlardan kaynaklanıyor olabilir.

Bakteri DNA'sının içme sularında tespit edildiği Ceylanköy, Hamzabey ve Tatarköy köylerinin nüfusu sırasıyla 485, 352 ve 853 iken, su örneklerinin alındığı tarihte kan alınan gönüllü sayısı sırasıyla 14, 18 ve 42'dir. Seropozitif kişi tespit edilememesinin bir diğer nedeni katılım sayısının azlığı olabilir. Nitekim 2006 yılında yapılan seroprevalans çalışmasında Ceylanköy'de 2 olguda seropozitiflik saptanmışken, 2016 yılında aynı köyde hiç seropozitif olguya rastlanmamış olması da bu olasılığı destekler niteliktedir (18).

Çalışmada gönüllülerde seropozitiflik tespit edilmemiş fakat etken DNA'sı PCR ile sularda gösterilmiştir. Bu da geçmiş yıllarda farelerde tespit edilen bakterinin fareler aracılığıyla suları kontamine ettiğini desteklemektedir. Köy muhtarları ve köy halkı suların klorlanması, derelerden veya açık alanlardan su içilmemesi, dere suyuyla temas edilmemesi konularında bilgilendirilmiş ve olası bir salgın engellenmiştir. Sunulan çalışma tularemi açısından riskli bölgelerin yakından takip edilmesinin olası salgınları önlemede oldukça önemli olabileceğini göstermiştir. Özellikle geçmiş yıllarda etkenin fareler, sular veya insanlarda var olduğunun bilindiği bölgelerde olası kaynaklar (kemiriciler, keneler, sinekler, sular vb.) etken varlığı açısından araştırılmalıdır. Ayrıca kırsal kesimde yaşayanların içme suları ve hastalık hakkında sürekli bilgilendirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.

Teşekkür

Çalışma boyunca desteklerinden dolayı Kırklareli Halk Sağlığı Müdürü Dr. Çiğdem Cerit'e, Kırklareli Halk Sağlığı Müdürlüğü çalışanlarına, Kaynarca Belediye Başkanı Serdar Türker'e, Kavaklı Belediye Başkanı Gürel Koşdemir'e ve çalışmaya dahil edilen bütün köy muhtarlarına ve gönüllü katılımcılara teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

1. Şahin İ. Tulareminin genel epidemiyolojik özellikleri. *In:* Gürcan Ş, ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 89-94.
2. Ohara Y, Sato T, Homma M. Epidemiological analysis of tularemia in Japan (yato-byo). *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1996; 13(3): 185-9. **[CrossRef]**
3. Francis E, Moore D. Identity of Ohara's disease and tularemia. *JAMA*. 1926; 86(18): 1329-32. **[CrossRef]**
4. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, *et al.* Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(21): 2763-73. **[CrossRef]**
5. Albayrak N, Çelebi B, Kavas S, *et al.* Tularemi lenfadeniti şüphesiyle alınan lenf aspiratı örneklerinde Mycobacterium tuberculosis varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bül*. 2014; 48(1): 129-34.
6. Gurcan S, Eskiocak M, Varol G, *et al.* Tularemia Re-Emerging in European Part of Turkey after 60 Years. *Jpn J Infect Dis.* 2006; 59(6): 391-3.
7. Ulu Kılıç A, Çiçek-Şentürk G, Tütüncü EE, *et al.* Atipik bulgularla seyreden iki tularemi olgusu. *Klimik Derg*. 2010; 23(3): 120-3.
8. Şencan İ, Kaya D, Öksüz Ş. Salmonelloz ön tanısı ile izlenen bir tifoidal tularemi olgusu. *Klimik Derg*. 2000; 13(3): 113-6.
9. Gürcan Ş. Francisella tularensis ve Türkiye'de tularemi. *Mikrobiyol Bül.* 2007; 41(4): 621-36.
10. Turhan V, Ardıç N, Şahinoğlu L, Beşirbellioğlu BA, Gedikoğlu S. A general view to tularemia cases in Turkey: on to a pure oropharyngeal type outbreak. *Anatolian J Clin Invest*. 2007; 1(2): 71-7.
11. Engin A, Altuntaş EE, Cankorkmaz L, *et al.* Sivas ilinde saptanan ilk tularemi salgını: 29 olgunun değerlendirilmesi. *Klimik Derg*. 2011; 24(1): 17-23. **[CrossRef]**
12. Willke A, Meric M, Grunow R, *et al.* An outbreak of oropharyngeal tularaemia linked to natural spring water. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 1): 112-6. **[CrossRef]**
13. Korkmaz M, Korkmaz P, Koç F, Gültekin H, Ünlüoğlu İ. Eskişehir ilinde görülen tularemi olgularının değerlendirilmesi. *Klimik Derg*. 2015; 26(3): 94-7. **[CrossRef]**
14. Eraksoy H. Türkiye'de su kaynaklı tularemi salgınları: geçmişten günümüze. *Klimik Derg*. 2013; 26(3): 83. **[CrossRef]**
15. Ünal Yılmaz G, Gürcan Ş, Özkan B, Karadenizli A. Trakya Bölgesi'nde farelerde kültür, seroloji ve moleküler yöntemlerle Francisella tularensis varlığının aranması. *Mikrobiyol Bül.* 2014; 48(2): 213-22. **[CrossRef]**
16. Plevnelioğlu KH. Memleketimizde tularemi. *Tedavi Kliniği ve Laboratuvarı Dergisi*. 1936; 6: 119-35.
17. Plevnelioğlu KH. Memleketimizde tularemi insanlara nasıl geçiyor? *Tedavi Kliniği ve Laboratuvarı Dergisi*. 1937; 7(27): 109-12.
18. Dedeoğlu Kılınç G, Gürcan S, Eskiocak M, Kılıç H, Kunduracılar H. Trakya bölgesinin köylerinde tularemi seroprevalansinin araştırılması. *Mikrobiyol Bül*. 2007; 41(3): 411-8.
19. Karadenizli A, Gurcan S, Kolayli F, Vahaboglu H. Outbreak of tularaemia in Golcuk, Turkey in 2005: report of 5 cases and an overview of the literature from Turkey. *Scand J Infect Dis*. 2005; 37(10): 712-6. **[CrossRef]**
20. Gürcan S, Varol Saraçoğlu G, Karadenizli A, *et al.* Tularemia as a result of outdoor activities for children in the countryside. *Turk J Med Sci*. 2012; 42(6): 1044-9.
21. Kılıç S, Yeşilyurt M. Tularemi: güncel tedavi seçeneklerine genel bir bakış. *Klimik Derg*. 2011; 24(1): 2-10.
22. Tatman Otkun M, Akçalı A, Karadenizli A, *et al.* Çanakkale'de hızla önlenen bir tularemi salgınının epidemiyolojik olarak değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bül*. 2011; 45(1): 48-57.
23. Helvacı S, Gedikoğlu S, Akalin H, Oral HB. Tularemia in Bursa, Turkey: 205 cases in ten years. *Eur J Epidemiol*. 2000; 16(3): 271-6. **[CrossRef]**
24. Gurcan Ş, Karabay O, Karadenizli A, Karagol Ç, Kantardjiev T, Ivanov I. Characteristics of the Turkish isolates of Francisella tularensis. *Jpn J Infect Dis.* 2008; 61(3): 223-5.
25. Şimşek H, Taner M, Karadenizli A, Ertek M, Vahaboğlu H. Identification of Francisella tularensis by both culture and real-time TaqMan PCR methods from environmental water specimens in outbreak areas where tularemia cases were not previously reported. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31(9): 2353-7. **[CrossRef]**
26. Karadenizli A. Moleküler tanı ve tiplendirme yöntemleri. *In:* Gürcan Ş, ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 283-8.
27. Oral B. Tularemi immünopatogenezi ve patolojisi. *In:* Gürcan Ş, ed. *Francisella tularensis ve Tularemi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 193-200.
28. Willke A. Tularemi. *Ankem Derg*. 2006; 20(Suppl. 2): 222-6.
29. Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Zoonotik Hastalıklar Daire Başkanlığı. *Tularemi Hastalığının Kontrolü İçin Saha Rehberi.* Ankara: Sağlık Bakanlığı, 2011.
30. Sjöstedt A, Eriksson U, Berglund L, Tärnvik A. Detection of Francisella tularensis in ulcers of patients with tularemia by PCR. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(5): 1045-8.